

Isolement et étude moléculaire de souches des virus de la clavelée et de l'ecthyma contagieux en Tunisie

E. Fakhfakh¹ C. Le Goff² E. Albina²
S. Zekri³ C. Seghaier¹ C. Odisseev¹
M.H. Jaafoura³ S. Hammami^{1*}

Mots-clés

Caprin – Ovin – *Capripoxvirus* – Virus ecthyma contagieux – *Parapoxvirus* – PCR – Phylogénie – Séquence nucléotidique – Tunisie.

Résumé

L'élevage des petits ruminants est touché par plusieurs pathologies infectieuses cutanées. Ainsi, la clavelée et l'ecthyma contagieux représentent deux maladies virales importantes à étudier de part leur allure enzootique et la perte économique qu'elles entraînent. L'objectif de ce travail a été l'isolement en Tunisie de souches virales responsables de ces deux pathologies cutanées et leur caractérisation par l'application et la comparaison de méthodes de diagnostic. La microscopie électronique a été utilisée pour une étude morphologique externe et interne des différentes souches isolées sur culture cellulaire. L'identification par PCR a concerné le gène de la thymidine kinase (TK), le gène de l'analogue du récepteur des chimiokines (CXCR-2) et le gène de la protéine P42K présente chez les *Parapoxvirus*. L'identification moléculaire très sensible et très spécifique des souches de *Capripoxvirus* a été complétée par une analyse phylogénétique.

■ INTRODUCTION

L'économie de la plupart des pays du Sud est basée sur l'agriculture et l'élevage. En Afrique du Nord, l'intérêt médical et sanitaire a souvent été porté sur les bovins au détriment des petits ruminants, probablement à cause de leur grande capacité d'adaptation aux conditions difficiles de sécheresse et de pénurie.

En Tunisie, le cheptel ovin compte en moyenne sept millions de têtes. Il est touché par différentes maladies qui constituent une menace pour le développement du secteur agricole. La clavelée et l'ecthyma contagieux sont parmi les affections les plus importantes fréquemment observées en élevage de petits ruminants ; elles revêtent généralement une allure enzootique. L'atteinte par ces deux infections virales cutanées se traduit par une mortalité chez les jeunes animaux, une chute de la reproduction et de la production chez les adultes ; les animaux guéris deviennent généralement des non-valeurs économiques. Devant une telle situation, il est impératif d'instaurer des moyens de diagnostic fiables et rapides

vis-à-vis de ces deux poxviroses. Cet objectif repose essentiellement sur l'isolement, la caractérisation et l'identification des différentes souches virales responsables ; il constitue également une approche préliminaire pour une étude épidémiologique moléculaire des souches locales de *Capripoxvirus*.

■ MATERIEL ET METHODES

Suite à une investigation réalisée sur l'ensemble du pays, 63 prélèvements ont été obtenus à partir d'ovins présentant des lésions cutanées typiques de clavelée et/ou d'ecthyma contagieux avec parfois atteinte de l'état général. La race, l'âge et le sexe n'ont pas été pris en considération. Les échantillons prélevés étaient composés de papules, de pustules et de croûtes. Ont été comptées respectivement 23 et 40 lésions cutanées douteuses de clavelée et d'ecthyma contagieux. Chaque échantillon a été traité sous forme de filtrat infectieux.

Les techniques expérimentales conduites pour l'identification des isolats suspects de clavelée et d'ecthyma contagieux ont été les mêmes ; elles ont été effectuées en deux étapes décrites ci-après.

Isolement et observation de souches virales

Culture cellulaire

Une étape préliminaire de premier et deuxième passage sur culture cellulaire sensible a concerné la totalité des 63 prélèvements.

1. Institut de la recherche vétérinaire de Tunisie, 14 rue Djebel Lakhthar, 1006 Tunis, Tunisie

2. Cirad, département Emvt, TA30/G, campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

3. Faculté de Médecine de Tunis, rue Djebel Lakhthar, 1006 Tunis, Tunisie

* Tél. : +216 71 56 26 02 / 56 43 21 ; fax : +216 71 56 96 92

E-mail : hammami.salah@iresa.agrinet.tn

Ces premiers essais d'isolement ont été réalisés sur culture primaire de testicules d'agneau (TAP) établie en tapis de cellules âgées de 4 à 5 jours et confluentes à 90 p. 100. Pour chaque échantillon, une dose d'1 ml de filtrat infectieux a été inoculée par boîte de culture cellulaire de 25 cm² préalablement vidée de son milieu d'entretien. Le filtrat d'inoculation a été obtenu à partir du broyage des lésions cutanées à l'aide d'un mortier, et en présence de sable stérile et de milieu (MEM Dubelco, 10 p. 100 SVF), puis filtration de la solution obtenue à 0,45 µm. Le contact cellules-inoculum a été appliqué durant 1 h à température ambiante suivi d'1 h à 37 °C dans une étuve à 5 p. 100 de CO₂. L'inoculum a ensuite été éliminé, puis le même milieu a été ajouté. La culture a ainsi été maintenue à 37 °C jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathogène (ECP) marqué ou à défaut jusqu'à 12 jours postinoculation. Les échantillons présentant un ECP marquant ont par la suite été inoculés sur des cellules de lignées testiculaires (OA3.Ts) ; le protocole appliqué a été celui décrit précédemment.

Microscopie électronique

La microscopie électronique a concerné l'examen direct des lésions cutanées et la réalisation de coupes ultra-fines de culture cellulaire inoculée.

L'examen direct a été effectué par imprégnation négative des croûtes et des papules. Chaque lésion a été broyée en présence d'eau bidistillée stérile ; une goutte de cette solution a été déposée sur une grille de microscopie électronique de 200 mesh sans Formvar.

Tableau I

Isolement et identification de souches virales d'ecthyma contagieux

Inoc	Cult. cell. OA3.Ts		Microsc. électron.		PCR		
	Ecp1	Ecp2	Ex. dir.	Ex. cp.	TK	IL8	P42K
E3	+	++	+	+	—	—	+
E14	+	?	+	+	—	—	+
E20	+	+	+	+	—	—	+
E31	+	+	+	+	—	—	+
E38	+	?	+	+	—	—	+

Inoc : numéro d'inoculum

Cult. cell. : culture cellulaire

OA3.Ts : lignée cellulaire de testicules d'agneau

Ecp1 : effet cytopathogène observé au 1^{er} passage

Ecp2 : effet cytopathogène observé au 2^e passage

++ : effet cytopathogène accentué

+

?

Microsc. électron. : microscopie électronique

Ex. dir. : examen direct

+

Ex. cp. : examen sur coupes de culture cellulaire inoculée

+

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

TK : gène codant la thymidine kinase

IL8 : gène codant le récepteur de l'interleukine 8

P42K : gène codant la protéine de l'enveloppe des *Parapoxvirus*

+

— : absence d'amplification et de révélation du gène

Après un temps de contact de 10 min et séchage, la face traitée de la grille a été contrastée à l'acide phosphotungstique à 2 p. 100, puis observée au microscope.

L'examen sur culture cellulaire inoculée a été réalisé à partir de boîte T25 présentant un tapis cellulaire confluent de 95 p. 100 et un ECP prononcé selon le cas. La culture a été rincée et récupérée par grattage en présence de CaCl₂ 1M. Le culot cellulaire obtenu après centrifugation a été fixé au glutaraldéhyde à 3 p. 100. Il a ensuite été rincé et immergé dans du tétroxyde d'osmium à 2 p. 100. L'échantillon ainsi déshydraté a été inclus dans un mélange préparé essentiellement à partir d'agar. Cette étape d'inclusion a duré 36 h et a été suivie d'une polymérisation à l'étuve. L'examen optique a été réalisé sur des coupes ultra-fines de 60 à 70 nm déposées sur des grilles de 150 mesh. Pour l'observation, un double contraste a été mis en œuvre à base d'acétate d'uranyle à 2 p. 100 et de citrate de plomb à 0,2 p. 100.

Identification de souches virales

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'étape de caractérisation moléculaire a concerné 10 prélèvements de terrain (tableaux I et II) et la souche vaccinale Romania 65 utilisée pour l'immunisation du cheptel ovin national contre la clavelée. La souche de référence Kenya *Sheeppox* I (KSI), a été choisie comme témoin positif.

Tableau II

Isolement et identification de souches virales de clavelée

Inoc	Cult. cell. OA3.Ts		Microsc. électron.		PCR		
	Ecp1	Ecp2	Ex. dir.	Ex. cp.	TK	IL8	P42K
C4	++	++	+	+	+	+	—
C9	++	+	+	+	+	+	—
C12	+	?	—	+	+	+	+
C13	?	++	+	+	+	+	—
C19	?	?	—	+	+	+	+

Inoc : numéro d'inoculum

Cult. cell. : culture cellulaire

OA3.Ts : lignée cellulaire de testicules d'agneau

Ecp1 : effet cytopathogène observé au 1^{er} passage

Ecp2 : effet cytopathogène observé au 2^e passage

++ : effet cytopathogène accentué

+

?

Microsc. électron. : microscopie électronique

Ex. dir. : examen direct

+

— : absence de visualisation de structures virales de *Sheeppox virus*

Ex. cp. : examen sur coupe de culture cellulaire inoculée

+

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

TK : gène codant la thymidine kinase

IL8 : gène codant le récepteur de l'interleukine 8

P42K : gène codant la protéine de l'enveloppe des *Parapoxvirus*

+

— : absence d'amplification du gène

Revue Élev. Méd. vét. Pays trop., 2005, 58 (1-2) : 7-14

8

Les gènes ciblés au cours de cette étude ont été :

1. Le gène TK codant la thymidine kinase (5) ; pour cela, deux couples d'amorces ont été désignés :

– le couple (TK7, TK8) encadrant une région de 680 pb

TK7 5'-acttatcagattttgttacgacattg-3'

TK8 5'-cgatgagttctatttctttcttag-3'

– le couple (TK11, TK12) encadrant une région de 420 pb

TK11 5'-ataggacctatgtttctggcaa-3'

TK12 5'-ttagaaatgcggcgtcttataaca-3'

2. Le gène codant le récepteur analogue à l'interleukine 8 (3) ; son identification a concerné la portion 3L de longueur 1 200 pb amplifiée par cinq amorces déterminées comme suit :

chim1 5'-agtgtatgattaagtaagcataac-3'

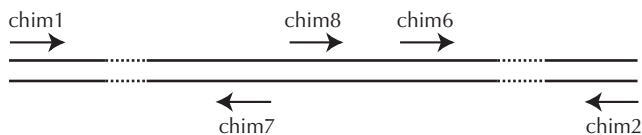
chim2 5'-ttttttattttatccaatgctaatactacc-3'

chim6 5'-gatgagattgatagtgacctagctgtagt-3'

chim7 5'-cctaaactccggttttagcgatactatcg-3'

chim8 5'-atggagtttaggagattgtgtgt-3'

La localisation de ces amorces sur la portion 3L du gène est représentée dans le schéma suivant :



3. Le gène codant B2L de la protéine de l'enveloppe du virus de l'ecthyma contagieux ; la détection a été réalisée par le biais d'un seul couple d'amorces qui encadrait une région de 594 pb. Il a été désigné comme suit (6) :

PPP1 5'-gtgtccacgatgagcagct-3'

PPP4 5'-tacgtgggaagcgctcgct-3'

La PCR a été réalisée à partir du mélange réactionnel suivant : tampon 10 x 5 µl, dNTP 100 x 0,5 µl, chaque amorce a été utilisée à une concentration de 200 ng/µl à raison de 2 x 1 µl par couple d'amorces, la Taq DNA polymérase a été diluée de moitié pour obtenir 2,5 U/µl. L'ADN à analyser a été extrait avec le kit Qiagen Dneasy Tissue ; il a ensuite été utilisé à une concentration de 50 à 100 ng/µl, l'ensemble réactionnel a été ajusté à 50 µl avec de l'eau distillée stérile.

La réaction a été effectuée à l'aide d'un appareil Gene Amp PCR system 2400 ; le programme établi a été le même pour les trois détections géniques et n'a différé qu'au niveau de la température d'hybridation des amorces. L'ADN amplifié a été soumis à une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1 p. 100 (NuSieve GTG agarose, BMA, Rockland, USA) pour la révélation. Les échantillons présentant une faible concentration d'ADN ont de nouveau été amplifiés par une deuxième PCR. La purification de l'ADN amplifié a été réalisée par électrophorèse horizontale en bande unique sur gel d'agarose ; l'ADN purifié a ensuite été récupéré à l'aide du kit Sephadex (Amersham Pharmacia).

Etude phylogénétique primaire

Dans cette partie n'ont été considérés que les isolats de terrain de *Capripoxvirus* identifiés par PCR et la souche vaccinale Romania 65 (1) ; la liste exhaustive est présentée au tableau III. Le séquençage a concerné la partie amplifiée par (chim2-chim6) de la portion 3L du gène codant le récepteur analogue à l'interleukine 8 (IL8). Le produit d'analyse a été séquençé au moins deux fois pour chaque échantillon et comparé à la séquence homologue de la souche de référence KSI (cour 2-6) qui a été elle aussi séquençée.

L'ADN pur a été utilisé à une concentration de 50 ng par échantillon et par réaction. Cette méthode, basée sur celle de Sanger,

Tableau III

Liste des souches virales utilisées pour les alignements multiples

Echantillon séquencé	Identifiant	Nature de l'échantillon
C3	C3P3B	Souche de terrain
C4	CC4P2B	Souche de terrain
C9	CC9P2B	Souche de terrain
C13	CC13P2B	Souche de terrain
C17	C17P2B	Souche de terrain
C18	C18P1B	Souche de terrain
C23	C23B2B	Souche de terrain
C Maroc	CMAROCB	La souche vaccinale Romania 65
Cour 2-6	COUR2-6B	La souche de référence Kenya Sheepox I (KSI)
LSDRIL8	AF325528	Séquence homologue du virus de la dermatose nodulaire contagieuse (<i>lumpy skin disease</i>), isolat Neethling 2490 Kenya
SPV-K2R	L21931	Séquence homologue de la souche de <i>Swinepox virus</i> Kasza
SPVRIL8	AF410153	Séquence homologue du <i>Swinepox virus</i> isolat 17077-99 (USA 1999)

a été non radioactive et a eu pour principe de base l'utilisation des quatre didésoxynucléotides marqués (*kit* Big Dye, Perkin Elmer). Le milieu réactionnel a été le suivant :

x µl d'ADN 50 ng
1 µl d'amorce (chim2 ou chim6) à 3,2 pmol/µl
4 µl de *mix* BDT
2 µl de tampon 5X
x µl d'eau q.s.p. 20 µl de volume total

Le séquençage a été réalisé sur gel de polyacrylamide préchauffé, les échantillons ont été précipités et dénaturés 2 min 30 s à 95 °C, puis remis directement dans la glace. La migration a duré 10 h et s'est faite pendant la nuit ; l'analyse des séquences a été effectuée le lendemain.

L'alignement multiple des séquences en acides nucléiques et en acides aminés a été réalisé à l'aide du logiciel Vector NTI (Invitrogen). Pour une analyse comparative, la séquence homologue de trois poxvirus disponibles a été ajoutée dans les banques de séquences : le virus de la dermatose nodulaire contagieuse ou *lumpy skin disease* (LSDVRIL8) (13), le *Swinepox virus* (SPVRIL8) (10) et la souche Kasza (SPV-K2R) (2). Dans les séquences qui suivent, n'ont été notées que les additions ou substitutions de bases par rapport à la séquence consensus (figure 1). La constitution de l'arbre de phylogénie, obtenu sur la base de 1 000 répétitions avec le logiciel Phylip, a complété ce travail (figure 2).

■ RESULTATS

Ecthyma contagieux

Culture cellulaire

Un ECP sur cellules TAP a été observé dans 68 p. 100 des cas au premier passage (17/40) ou au second passage (10/40). Cinq échantillons ont montré des ECP accentués au premier et second passages, ainsi qu'un aspect cellulaire fusiforme caractéristique

	1	50		251	300
CC9P2B (1)	CC9P2B (239)
C17P2B (1)	C17P2B (239)
CC13P2B (1)	CC13P2B (239)
C3P3B (1)	C3P3B (239)
C23P2B (1)	C23P2B (239)
C18P1B (1)	C18P1B (239)
CMAROCB (1)	CMAROCB (239)
CC4P2B (1)	CC4P2B (239)
LSD-RIL8 (1)GC.....G...T...	LSD-RIL8 (239)
COUR2-6B (1)GC.....G...T...	COUR2-6B (239)
SPVRIL8 (1)	TA...GCG CA.C.TAT...G...GTATA...T...CC.TA.GT.	SPVRIL8 (251)	C...G...T...T.C...AG.GGTT.G...T.AG...T.G.CG.A.G
SPV-K2R (1)	TA...GCG CA.C.TAT...G...GTATA...T...CC.TA.GT.	SPV-K2R (251)	C...G...T...T.C...AG.GGTT.G...T.AG...T.G.CG.A.G
Consensus (1)	CCAGTAAATCAATAACGATAAGGACAAACAAATACGGAATTGTACTTAG	Consensus (251)	GTTATTATAAAATCTTAAATACTTTAAACACATCAC-AAACAAAGAATA-
	51	100		301	350
CC9P2B (51)	CC9P2B (287)
C17P2B (51)	C17P2B (287)
CC13P2B (51)	CC13P2B (287)
C3P3B (51)	C3P3B (287)
C23P2B (51)	C23P2B (287)
C18P1B (51)	C18P1B (287)
CMAROCB (51)	CMAROCB (287)
CC4P2B (51)	CC4P2B (287)
LSD-RIL8 (51)C.....	LSD-RIL8 (287)G.....
COUR2-6B (51)C.....	COUR2-6B (287)G.....
SPVRIL8 (51)	CTGTTCC.C...T.AT.A...CT.G...ATT...TAG...CG...TCTAA.C	SPVRIL8 (301)	T.T...T.T...A.T...A.AA.G...G.A...TC...A.A.G
SPV-K2R (51)	CTGTTCC.C...T.AT.A...CT.G...ATT...TAG...CG...TCTAA.C	SPV-K2R (301)	T.T...T.T...A.T...A.AA.G...G.A...TC...A.A.G
Consensus (51)	TATGGTGGTTGGATTGTCTCAATTATGAACTCTTCCAATAATGTTAT	Consensus (301)	-AGAAAGCCATAAAGATGGTGTGTTTAAATGTTATCTGTTAGTATGTTT
	101	150		351	400
CC9P2B (101)	CC9P2B (336)
C17P2B (101)V.....	C17P2B (336)
CC13P2B (101)	CC13P2B (336)
C3P3B (101)	C3P3B (336)
C23P2B (101)	C23P2B (336)
C18P1B (101)	C18P1B (336)
CMAROCB (101)	CMAROCB (336)
CC4P2B (101)	CC4P2B (336)
LSD-RIL8 (101)GT.....	LSD-RIL8 (336)
COUR2-6B (101)GT.....	COUR2-6B (336)
SPVRIL8 (101)	A...C...G...T.TTCTCA...G.CT...AG.T.T...ACCA...C.C.G	SPVRIL8 (351)	...GGA.T...GC.CTA.A.CGT.C...A.GA.AG.GA...A.TGT.AGC...T
SPV-K2R (101)	A...C...G...T.TTCTCA...G.CT...AG.T.T...ACCA...C.C.G	SPV-K2R (351)	...GGA.T...GC.CTA.A.CGT.C...A.GA.AG.GA...A.TGT.AGC...T
Consensus (101)	TTTATGA-AACAAAAAAGTATATGGAATAACACATTGTCTGATGTTTAA	Consensus (351)	TTTACTCCATTAGTGTAACTGATTTGTTTTCATCGTTGATTTGTTAA
	151	200		401	450
CC9P2B (150)	CC9P2B (386)
C17P2B (150)	C17P2B (386)
CC13P2B (150)	CC13P2B (386)
C3P3B (150)	C3P3B (386)
C23P2B (150)	C23P2B (386)
C18P1B (150)	C18P1B (386)
CMAROCB (150)	CMAROCB (386)
CC4P2B (150)	CC4P2B (386)
LSD-RIL8 (150)	LSD-RIL8 (386)G...G.....
COUR2-6B (150)	COUR2-6B (386)G...G.....
SPVRIL8 (151)	ACG...G...ACT.C.T...CGCA...CATA...AG.C.G...GC.AA	SPVRIL8 (401)	ACA.C...A.AT...T...GACATC.GT.CC.CTA.C.A...G...CTAT
SPV-K2R (151)	ACG...G...ACT.C.T...CGCA...CATA...AG.C.G...GC.AA	SPV-K2R (401)	ACA.C...A.AT...T...GACATC.GT.CC.CTA.C.A...G...CTAT
Consensus (151)	T--AACGATAATG--CAAAAT--TTGG--AAATTATTATATAAATTT	Consensus (401)	ATGTTTTAGTGGATGTTATGCAATTAAGATT--TGTCACCTTGCA--
	201	250		451	498
CC9P2B (189)	CC9P2B (430)
C17P2B (189)	C17P2B (430)
CC13P2B (189)	CC13P2B (430)
C3P3B (189)	C3P3B (430)
C23P2B (189)	C23P2B (430)
C18P1B (189)	C18P1B (430)
CMAROCB (189)	CMAROCB (430)
CC4P2B (189)	CC4P2B (430)
LSD-RIL8 (189)C.....	LSD-RIL8 (430)T.....
COUR2-6B (189)C.....	COUR2-6B (430)T.....
SPVRIL8 (201)	A...G...C.CT...G...T.CC.G...TA...C...A...CG	SPVRIL8 (451)	GC.A...CC.TTT.G...G.C.A.C...GT...GCG.G...G...A...T
SPV-K2R (201)	A...G...C.CT...G...T.CC.G...TA...C...A...CG	SPV-K2R (451)	GC.A...CC.TTT.G...G.C.A.C...GT...GCG.G...G...A...T
Consensus (201)	TGAAATAAACATATTTGGAATGATTATACCGCTAATTTTGTCTATATT	Consensus (451)	--GTTCATGTAG-CTGAAATGTGTCTCTATGTCATTGTTTATCAAC

Figure 1 : alignement multiple des séquences en acides nucléiques du virus de la clavelée.

d'une inoculation par le virus de l'ecthyma contagieux (11). Ces cinq prélèvements ont fait l'objet d'une deuxième inoculation sur des cellules lignées de testicules d'agneaux OA3.Ts. Le résultat obtenu a différé par la présence d'ECP douteux (tableau I).

Microscopie électronique

Cette technique a été appliquée sur cinq prélèvements ayant produit un ECP (tableau I). Le contraste négatif à l'acide phosphotungstique a révélé la présence du virus de l'ecthyma contagieux dans la totalité des prélèvements (figure 3). L'observation de coupes ultra-fines a montré les différentes étapes de la morphogenèse virale (figure 4).

PCR

Cette technique n'a montré une amplification positive que pour le gène codant de la protéine de l'enveloppe P42K (tableau I) (figure 5).

Clavelée

Culture cellulaire

Parmi les seize échantillons (70 p. 100 de positifs) avec ECP au premier et/ou second passage, cinq échantillons ont été sélectionnés pour adaptation sur cellules OA3.Ts. Parmi ces cinq, trois isolats seulement ont développé un ECP caractéristique des poxvirus (tableau II). Les cellules infectées avaient une forme arrondie avec un aspect interne granuleux, témoin de la présence de particules virales dans le cytoplasme cellulaire (9).

Microscopie électronique

L'examen direct des papules a permis de visualiser trois échantillons positifs (tableau II) (figure 6). L'échantillon C12 a présenté une structure enchevêtrée en forme de cocon caractéristique

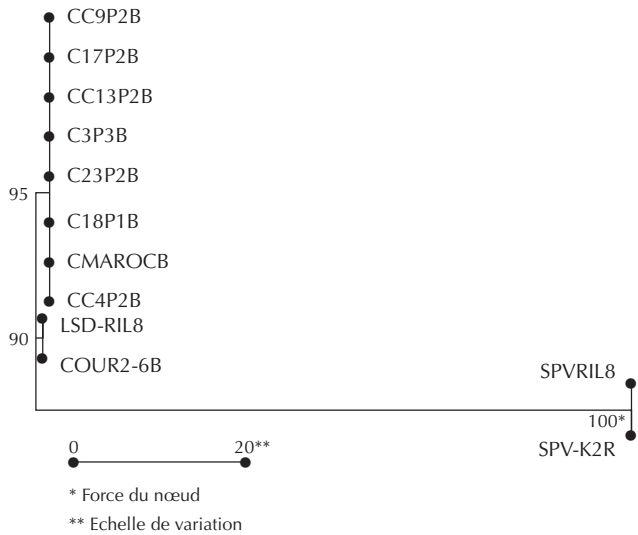


Figure 2 : arbre phylogénétique des séquences. L'échelle indique le pourcentage de substitutions en nucléotides.

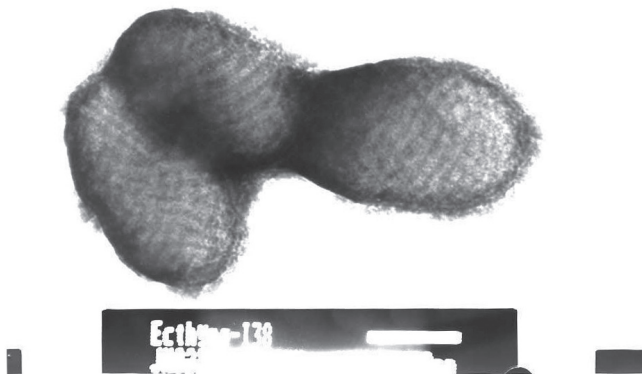


Figure 3 : particule virale d'ecthyma contagieux observée en coloration négative par microscopie électronique (laboratoire d'Embryo-histo-anatomopathologie, faculté de Médecine de Tunis) ; x 40K ; barre : 200 nm. A noter la forme de cocon et l'aspect enchevêtré typique au sein des poxvirus.

des *Parapoxvirus* et aucune structure virale n'a pu être identifiée au niveau de l'échantillon C19. L'étude des coupes ultra-fines a mis en évidence les différentes étapes de morphogenèse virale pour les cinq prélèvements suspects (figure 7).

PCR

Les résultats de l'amplification génique ont été visualisés pour le gène de la thymidine kinase et le gène du récepteur analogue à l'IL8 (tableau II, figure 8). Néanmoins, les échantillons C12 et C19 n'ont présenté une amplification positive que pour le gène P42K.

Séquençage

La longueur d'ADN séquencée obtenue n'a pas été la même pour tous les échantillons (tableau IV, figure 1). Le séquençage a permis de mettre en évidence trois groupes distincts de séquences. Le premier était constitué par les isolats de terrain et la souche vaccinale Romania. Ce groupe a présenté un taux de substitution en nucléotides et en acides aminés inférieur à 5 p. 100. Le second groupe était représenté par la séquence homologue (cour 2-6) de la souche KS1 et celle de la souche LSDVRIL8. En revanche, des taux de substitution en nucléotides et en acides aminés de 33,2 et 65,5 p. 100 ont été observés avec les deux souches des *Swinepox virus* constituant le troisième groupe (figure 2).

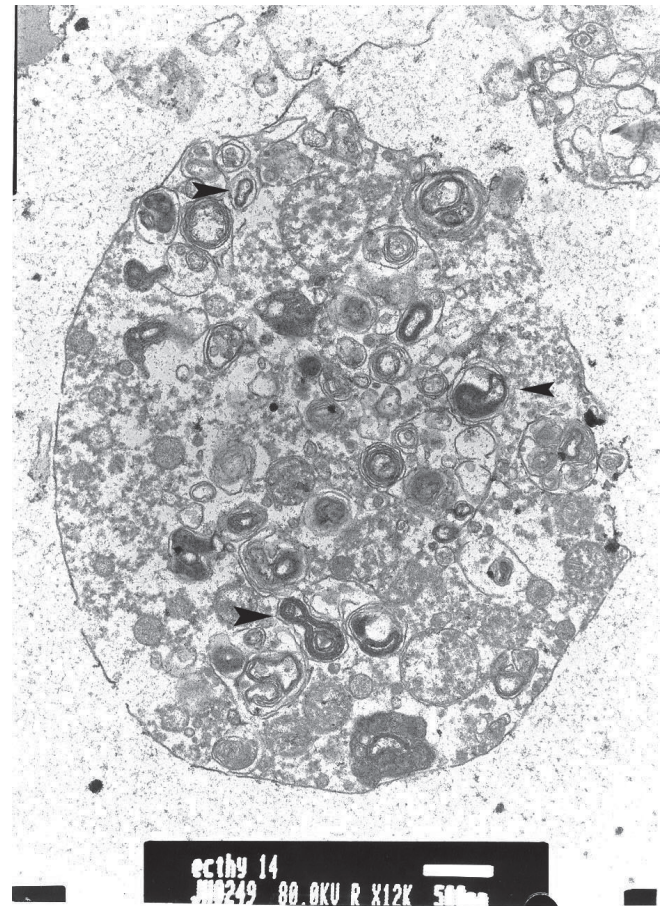


Figure 4 : particule virale d'ecthyma contagieux observée en coloration négative par microscopie électronique (laboratoire d'Embryo-histo-anatomopathologie, faculté de Médecine de Tunis) ; x 12K ; barre : 500 nm. Les flèches indiquent les différentes étapes de morphogenèse virale observées sur coupes ultra-fines cellulaires inoculées par le virus de l'ecthyma contagieux.

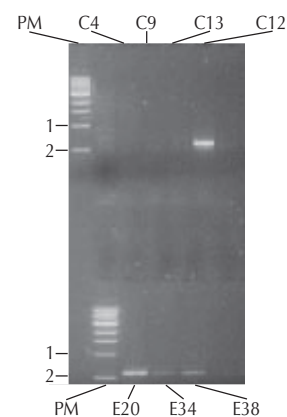


Figure 5 : amplification d'une portion de 594 pb du gène de la protéine P42K de l'enveloppe du virus de l'ecthyma contagieux.

PM : poids moléculaire. E20, E34, E38 : isolats suspects d'ecthyma contagieux confirmés positifs par microscopie électronique. C4, C9, C13 : isolats suspects de clavelée confirmés positifs par microscopie électronique. C12 : isolat suspect de clavelée et confirmé négatif par microscopie électronique. Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1 % TAE. 1 = 1 000 pb ; 2 = 500 pb.

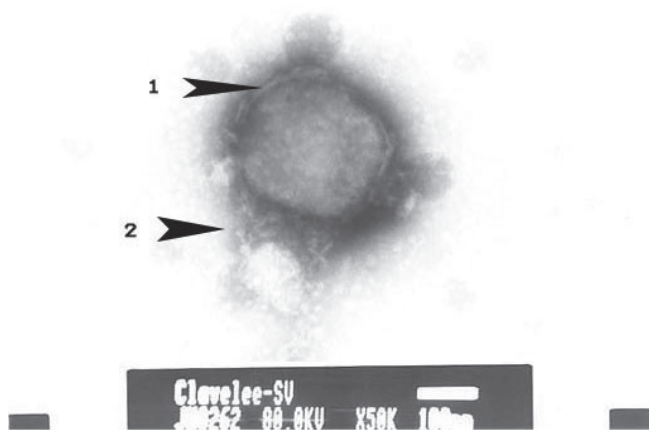


Figure 6 : particule virale de Sheeppox observée en coloration négative par microscopie électronique (laboratoire d'Embryo-histo-anatomopathologie, faculté de Médecine de Tunis) ; x 50K ; barre : 100 nm. 1 : capsule virale. 2 : virus du sheep pox ; forme rectangulaire à angles arrondis.

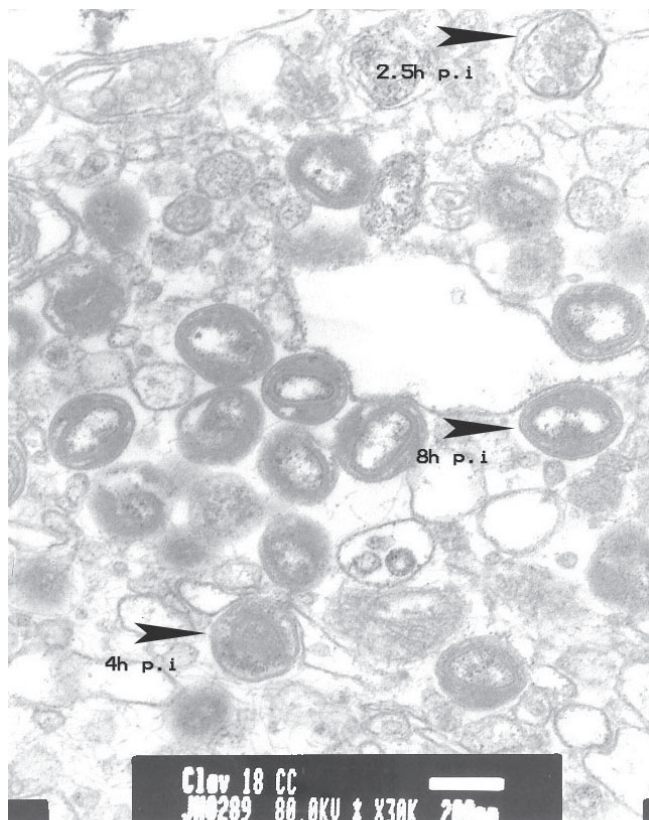


Figure 7 : coloration positive de particules virales de Sheeppox virus en cours de morphogenèse (laboratoire d'Embryo-histo-anatomopathologie, faculté de Médecine de Tunis). p.i : postinoculation ; x 30K ; barre : 200 nm.

■ DISCUSSION

L'enquête épidémiologique nationale menée par l'Institut de la recherche vétérinaire de Tunis en collaboration avec les services du Commissariat régional de développement agricole a représenté la partie appliquée. Son but était, d'une part, d'isoler des souches de *Capripoxvirus* et de *Parapoxvirus*, et de les identifier par différents moyens de diagnostic, et, d'autre part, de contribuer à

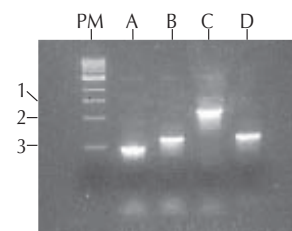


Figure 8 : amplification spécifique du gène de la TK par le couple d'amorces D. Amplification spécifique du gène du récepteur analogue à l'IL8 par le biais des trois couples d'amorces A, B, C. Exemple : isolat n° 9 suspect clavelée. PM : poids moléculaire. A : amplification par (chim1, chim7) de longueur 495 pb. B : amplification par (chim2, chim6) de longueur 650 pb. C : amplification par (chim1, chim2) de longueur 1 200 pb. D : amplification par (TK7, TK8) de longueur 680 pb. Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1 % TAE. 1 = 1 500 pb ; 2 = 1 000 pb ; 3 = 500 pb.

Tableau IV

Longueur des fragments obtenus après séquençage

Echantillon	Nb. séquençages	chim2 (pb)	chim6 (pb)
C3	3	580	590
C4	3	570	590
C9	3	590	580
C13	2	590	600
C17	2	590	600
C18	2	550	600
C23	2	577	600
C Maroc	2	550	560
cour 2-6	2	560	600

C3, C4, C9, C13, C17, C18, C23 : isolats de terrain identifiés par PCR

C Maroc : la souche vaccinale Romania 65

cour 2-6 : la souche de référence Kenya *Sheeppox* I (KSI)

une étude épidémiologique moléculaire sur une partie du génome des souches de *Capripoxvirus* isolées sur le terrain.

L'isolement viral sur culture cellulaire primaire a concerné un échantillonnage de 63 prélèvements (croûtes, papules) provenant d'animaux suspects de clavelée ou d'ecthyma contagieux. Les deux virus ont présenté les mêmes affinités cellulaires. Ils ont produit un ECP à partir du cinquième jour évoluant jusqu'au douzième jour postinoculation.

Le premier passage sur TAP a révélé la présence d'un ECP dans 43 p. 100 des cas suspects d'ecthyma contagieux et dans 22 p. 100 des cas suspects de clavelée. Au deuxième passage ces valeurs ont atteint respectivement 68 et 70 p. 100. La nature des résultats obtenus n'a confirmé en aucun cas la présence ou l'absence d'une souche virale suspectée préalablement. Ceci restait conditionné par la faculté d'adaptation de l'agent infectieux à son nouvel environnement cellulaire. Néanmoins, l'action de certains interférons cellulaires peut aussi entraîner la perte d'une souche isolée sur culture cellulaire (11).

A l'issue de cette première étude, 10 échantillons ont été sélectionnés (5 suspects d'ecthyma contagieux et 5 suspects de clavelée)

pour adaptation sur des cellules lignées de testicules d'agneaux OA3.Ts. Les résultats ont différé par la présence de cas douteux et une faible intensité d'ECP. Selon Ramisse et coll. (12), le système de répllication de choix des poxvirus est représenté par les cellules primaires de testicules et de rein d'agneau et les cellules d'embryon total de mouton.

La microscopie électronique a appuyé les résultats observés en culture cellulaire, notamment pour les dix échantillons choisis. L'examen direct par contraste négatif a confirmé que les ECP observés étaient dus à des isolats suspects d'ecthyma contagieux ou de clavelée. D'autre part, trois échantillons seulement ont présenté des structures virales semblables à celle des *Capripoxvirus*. On souligne que cette technique ne permet pas la distinction morphologique entre les *Capripoxvirus* et les autres poxvirus. À défaut, la visualisation de l'aspect enchevêtré caractéristique du virus de l'ecthyma contagieux met à profit cette application optique. L'examen de coupes ultra-fines à partir de culture cellulaire inoculée est plus spécifique. En effet, cette technique a montré un résultat positif sur la totalité des prélèvements, y compris l'échantillon C19 qui a présenté un résultat douteux par contraste négatif.

L'identification génomique par PCR des dix isolats traités a concerné le gène de la thymidine kinase, le gène P42K codant la protéine d'enveloppe de l'ecthyma contagieux et le gène de l'analogue au récepteur à l'IL8. La spécificité et la sensibilité de la PCR reposent essentiellement sur le choix des amorces. L'utilisation de cette technique a été largement appuyée par les travaux d'Ireland et Binopal (7), et Inoshima et coll. (6) pour l'identification des *Capripoxvirus* et des *Parapoxvirus*.

L'utilisation respective des deux couples d'amorces (TK7, TK8) et (TK11, TK12) n'a révélé une amplification de 680 pb et de 420 pb que pour les échantillons suspects de clavelée. Le gène TK a présenté une topographie conservée au sein de la majorité des poxvirus (5) à l'exception des *Parapoxvirus* où il est absent (14). D'autre part, l'identification du gène P42K a été constatée pour tous les isolats suspects d'ecthyma contagieux mais aussi pour l'échantillon C12 suspect de clavelée.

L'identification du gène analogue du récepteur à l'IL8 a intéressé la principale partie de ce travail. L'IL8 est un membre de la sous-famille des chimiokines de type C-X-C ; il intervient dans la réponse immunitaire en stimulant l'activité des neutrophiles (8). L'identification de ce gène a concerné la portion 3L du fragment HindIII Q2 du génome de la souche KSI (3). La détection a été réalisée par le biais de quatre couples d'amorces. Le couple d'amorces (chim2 chim6) a fonctionné sur la totalité des échantillons. Selon les travaux de Cao et coll. (3), les résultats obtenus ont confirmé l'isolement de souches de *Capripoxvirus* pour lesquelles la région Q2/3L identifiée ne figure qu'en une seule copie. Par comparaison, le *Swinepox virus* renfermait dans son génome deux phases de lecture identiques K2R et C3L situées chacune au niveau d'une extrémité terminale inversée ITR. La phase K2R était homologue au récepteur IL8-RB (CXC-R2) (10). Cette phase a servi d'échelle pour les alignements multiples de la partie séquençage. Concernant les isolats suspects en matière d'ecthyma contagieux, aucune amplification n'a été détectée. Ceci pouvait être attribué à la position du gène à l'extrémité terminale du génome. En effet, chez les *Parapoxvirus* les régions ITR sont très instables. Il y siège un phénomène de transposition-délétion capable d'entraîner la perte de la séquence recherchée (4).

Le fragment (chim2-chim6) identifié sur tous les échantillons a été séquencé. L'analyse phylogénétique de la souche de *Swinepox virus* SPVRIL8 et celle de LSDVRIL8 ont montré un faible pourcentage de substitutions en acides aminés (2). Toutes les séquences alignées ont été bornées sur la base des travaux de Cao et coll. (3).

La phase K2R homologue au récepteur IL8-RB (CXC-R2) (10) a servi d'échelle pour les alignements multiples de la partie séquençage. Ainsi, les *Swinepox virus* ont permis d'ancrer l'arbre phylogénétique. Sur ce dernier, trois groupes distincts de séquences ont été observés. Un lien de parenté ou de dissociation a été représenté entre les groupes. Les isolats de terrain et la souche Romania 65 ont formé un ensemble homogène et ceci malgré la diversité de leur origine géographique. Ce groupe a présenté un taux de substitutions en nucléotides inférieur à 5 p. 100 avec la séquence homologue de la souche KSI (cour 2-6) et celle de la souche LSDVRIL8. En revanche, une grande divergence nucléotidique de 33,2 p. 100 a été observée avec les deux souches de *Swinepox virus*. Ceci reste cohérent puisque ces dernières appartiennent à un genre différent (10). La conversion des séquences en acides aminés a montré un taux de variation de 5 p. 100 entre les isolats tunisiens et la souche de référence KSI (cour 2-6). Ceci a résulté de sept substitutions d'acides aminés sur 158 dues à sept mutations de bases. Quatre mutations de bases étaient silencieuses.

Les résultats obtenus ont montré la conservation de cette séquence au sein du genre des *Capripoxvirus*, et ceci malgré la diversité topographique des échantillons. Cette première approche incite à approfondir cette analyse sur un fragment plus long du gène appartenant à des isolats de diverses origines provenant de différentes espèces animales. Un échantillonnage ainsi constitué permettra de vérifier si cette portion de gène pourrait être un traceur épidémiologique des souches de *Capripoxvirus*.

■ CONCLUSION

Ce travail a abouti à l'identification de souches virales sauvages de *Capripoxvirus* et de *Parapoxvirus*. Chaque outil de diagnostic a présenté des avantages et des inconvénients vis-à-vis de la nature de l'infection suspectée. Ainsi la microscopie électronique reste la méthode de choix pour la révélation optique d'un *Parapoxvirus* par rapport à un *Capripoxvirus*. L'utilisation de la PCR pour la recherche de *Capripoxvirus* et de *Parapoxvirus* a été appuyée par plusieurs exemples. La détection du gène de la TK et de celui du récepteur analogue à l'IL8 a été possible sur toutes les souches suspectes appartenant au genre *Capripoxvirus*. En revanche, le gène codant pour la protéine virale de l'enveloppe de l'ecthyma contagieux (la P42K) a été identifié seulement dans les souches de *Parapoxvirus*. D'autre part, le profil génétique des souches de terrain de *Capripoxvirus* concernant la portion du gène analogue du récepteur de l'IL8 a été identique à celui de la souche vaccinale Romania 65, souche d'origine marocaine. Par ailleurs, le profil des souches de terrain a été très proche de celui de la souche vaccinale KSI. Ces résultats mettent en évidence la conservation de cette portion génique malgré la diversité géographique des souches considérées. Ceci incite donc à approfondir l'étude et la comparaison avec d'autres séquences du génome de ces souches.

BIBLIOGRAPHIE

1. ACHOUR H.A., BOUGUEDOUR R., BOUHBAL A., GUECHTOULI A., AOUSSAT M., 2000. Etude comparative du pouvoir immunisant de quelques souches atténuées de virus de la clavelée et d'un vaccin sensibilisé. *Revue sci. tech. Off. int. Epizoot.*, **19** : 773-783.
2. AFONSO C.L., TULMAN E.R., LU Z., BALINSKY C., OSORIO F.A., ZSAK L., KUTISH G.F., ROCK D.L., 2002. The genome of *Swinepox virus*. *J. Virol.*, **76** : 783-790.
3. CAO J.X., GERSHON P.D., BLACK D.N., 1995. Sequence analysis of HindIII Q2 fragment of *Capripoxvirus* reveals a putative gene encoding a G-protein-coupled chemokine receptor homologue. *Virology*, **209** : 207-212.

4. FLEMING S.B., LITTLE D.J., SULLIVAN J.T., MERCER A.A., ROBINSON A.J., 1995. Genomic analysis of a transposition-deletion variant of orf v reveals a 3.3 kbp region of non-essential DNA. *J. gen. Virol.*, **76**: 2969-2978.
5. GERSHON P.D., BLACK D.N., 1989. The nucleotide sequence around the *Capripoxvirus* thymidine kinase gene reveals a gene shared specifically with *Leporipoxvirus*. *J. gen. Virol.*, **70**: 525-533.
6. INOSHIMA Y., MOROOKA A., SENTSUI H., 2000. Detection and diagnosis of *Parapoxvirus* by the polymerase chain reaction. *J. virol. Methods*, **84**: 201-207.
7. IRELAND D.C., BINEPAL Y.S., 1998. Improved detection of *Capripoxvirus* in biopsy samples by PCR. *J. virol. Methods*, **74**: 1-7.
8. LALANI A.S., NESS T.L., SINGH R., HARRISSON J.K., SEET B.T., KELVIN D.J., MCFADDEN G., MOYER R.W., 1998. Functional comparisons among members of the poxvirus T1/35 kDa family of soluble CC-chemokine inhibitor glycoproteins. *Virology*, **250**: 173-184.
9. LEFEVRE P.C., 1983. La variole ovine (clavelée) et la variole caprine. Maisons-Alfort, France, Gerdar-lemvt, 171 p.
10. MASSUNG R.F., JAYARAMA V., MOYER R.W., 1993. DNA sequence analysis of conserved and unique regions of *Swinepox virus*: identification of genetic elements supporting phenotypic observations including a novel G protein-coupled receptor homologue. *Virology*, **197**: 511-528.
11. PRECAUSTA P., 1974. Clavelée. In : Bricout F., Joubert L., Huraux J.M., édts, Manuel de diagnostic séro-immunologique des viroses humaines et animales, 1^{ère} éd. Paris, France, Maloine, p. 239-241.
12. RAMISSE J., ASSO J., HASSANI A., ANANE O., JEMLI J., 1978. Culture du virus claveléux sur cellules : application à la vaccination et au contrôle de l'immunité. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **31** : 11-19.
13. TULMAN E.R., AFONSO C.L., LU Z., ZSAK L., KUTISH G.F., ROCK D.L., 2001. Genome of lumpy skin disease virus. *J. Virol.*, **75**: 7122-7130.
14. VAN REGENMORTEL M.H., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., 2000. Poxviridae. In: virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego, CA, USA, Academic Press, p. 137-157.

Reçu le 01.04.2004, accepté le 15.06.2005

Summary

Fakhfakh E., Le Goff C., Albina E., Zekri S., Seghaier C., Odisseev C., Jaafoura M.H., Hammami S. Isolation and Molecular Study of Sheep Pox and Orf Viruses in Tunisia

Small ruminant farms are affected by several infectious cutaneous diseases. Thus, sheep pox and contagious pustular dermatitis represent two major viral diseases that need investigating as they can reach endemic proportions and cause important economic losses. The aim of this work was to isolate the viral strains at the origin of both diseases in Tunisia, and to characterize them by applying and comparing several diagnosis techniques. Electronic microscopy was used to study the external and internal morphology of the various strains isolated on cell culture. Identification by PCR concerned the thymidine kinase (TK) gene, the IL8 receptor-like gene specific of *Capripoxvirus*, and the P42K gene specific of *Parapoxvirus*. The very sensitive and very specific molecular identification of *Capripoxvirus* wild strains was completed by a phylogenetic analysis.

Keywords: Goat – Sheep – *Capripoxvirus* – Contagious ecthyma virus – *Parapoxvirus* – PCR – Phylogeny – Nucleotide sequence – Tunisia.

Resumen

Fakhfakh E., Le Goff C., Albina E., Zekri S., Seghaier C., Odisseev C., Jaafoura M.H., Hammami S. Aislamiento y estudio molecular de cepas de virus de la viruela (lengua azul) y del ectima contagioso en Tunisia

La cría de los pequeños rumiantes está siendo afectada por varias patologías infecciosas cutáneas. Así, la viruela y el ectima contagioso representan dos enfermedades virales importantes a estudiar, a causa de su aspecto enzootico y por la pérdida económica que conllevan. El objetivo del presente estudio fue el aislamiento en Tunisia de cepas virales responsables de estos dos problemas cutáneos y su caracterización mediante la aplicación y la comparación de métodos de diagnóstico. Se utilizó la microscopía electrónica para un estudio morfológico externo e interno de las diferentes cepas aisladas a partir del cultivo celular. La identificación mediante PCR concernió el gen de la timidina-quinasa (TK), el gen del receptor análogo de las quimocinas (CXCR-2) y el gen de la proteína P42K presente en los *Parapoxvirus*. La identificación molecular muy sensible y específica de las cepas de *Capripoxvirus* fue completada mediante un análisis filogenético.

Palabras clave: Caprino – Ovino – *Capripoxvirus* – Virus ectima contagioso – *Parapoxvirus* – PCR – Filogenia – Secuencia nucleotídica – Túnez.